

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202100041 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.08.31

(22) Дата подачи заявки
2021.02.15

(51) Int. Cl. C12N 1/20 (2006.01)
A61K 35/745 (2006.01)
A61K 35/747 (2006.01)
C12R 1/01 (2006.01)
C12R 1/225 (2006.01)

(54) ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ БИФИДО- И ЛАКТОБАКТЕРИЙ
И СПОСОБ ЕЕ ПРИГОТОВЛЕНИЯ

(96) 2021000019 (RU) 2021.02.15

(71) Заявитель:
ДЕНИСОВ ДМИТРИЙ
ЕВГЕНЬЕВИЧ (RU)

(72) Изобретатель:
Мухаметханов Наиль Ханифович,
Баймиев Андрей Ханифович, Денисов
Дмитрий Евгеньевич (RU)

(57) Изобретение относится к медицине и ветеринарии, в частности, к микробиологии и биотехнологии. Предложена высокоэффективная питательная среда для культивирования бифидобактерий и способ ее приготовления на основе доступного и экологически чистого растительного сырья, содержащая в качестве источников углеводов и белка: соевый пептон, дрожжевой экстракт, глюкозу, цистеин, минеральные соли: марганец сернокислый, магний сернокислый, калий фосфорнокислый однозамещенный и двухзамещенный, воду, а также аскорбиновую кислоту, натрий хлористый и натрий фосфорнокислый. Использование предлагаемой среды позволяет за 20-24 ч культивирования при 37°C получить биомассу бифидобактерий с содержанием жизнеспособных клеток не менее $4,5-7 \times 10^9$.

A1

202100041

202100041

A1

C12N1/20

ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ БИФИДО – И ЛАКТОБАКТЕРИЙ И СПОСОБ ЕЕ ПРИГОТОВЛЕНИЯ

Описание изобретения

Область техники

Изобретение относится к медицине и ветеринарии, в частности, к микробиологии и биотехнологии, и может быть использовано при производстве лечебно-профилактических и лекарственных препаратов.

5 В настоящее время основным, наиболее оправдавшим себя приемом коррекции нарушенного микробиоценоза кишечника человека является применение препаратов и продуктов на основе микроорганизмов-пробиотиков и, в первую очередь, бифидо- и лактобактерий.

Бифидо- и лактобактерии занимают особое место среди различных
10 представителей нормальной микрофлоры человека. Микробиоценоз человека состоит на 85-98% из бифидо - лактобактерий. Именно бифидофлоре принадлежит ведущая роль в поддержании и нормализации микробиоценоза кишечника, неспецифической резистентности организма, улучшении
15 белкового и минерального обмена и др. Дефицит бифидобактерий является одним из патогенетических факторов длительных кишечных дисфункций у детей и взрослых, он ведет к нарушению минерального обмена, процессов
кишечного всасывания, белкового и жирового обмена, к формированию хронических расстройств пищеварения. В связи с этим поиск новых, более
эффективных средств бифидо- и лактотерапии, а также технологических
20 приемов, позволяющих оптимизировать их производство, в особенности процесс культивирования бифидо- и лактобактерий, являются перспективными.

5 Размножение бифидобактерий обусловлено огромным количеством факторов роста. Многие виды нуждаются в биотине, пантотеновой кислоте, цистеине, рибофлавине, пуриновых и пиримидиновых основаниях, пептидах, коферменте А, олигосахаридах, некоторых ненасыщенных жирных кислотах и др. Отдельные штаммы нуждаются в углекислом газе, аммиаке, гистидине.

10 Из аминокислот требуется лизин, пролин, серин, аланин, аспарагиновая и глутаминовая кислоты. Некоторые штаммы бифидобактерий растут при наличии азотфиксирующих олигосахаридов - N-ацетил-глюкозамина, N-ацетил-галактозамина, N-ацетил-маннозамина и др, которые отсутствуют в коровьем молоке (содержатся в женском молоке).

15 Известны различные питательные среды для культивирования бифидобактерий и лактобактерий такие как казеиново-дрожжевая, печеночная среда Блаурокка, среда "Эпидермат" и целый ряд других. В их состав в качестве аминного питания входят пептоны, перевары и гидролизаты животного происхождения. Углеводная часть представлена

20 преимущественно лактозой. Бифидобактерии можно также выращивать на молоке.

Для культивирования бифидобактерий применяется печеночно-цистеиновая среда (среда Блаурока) следующего состава, г/л:

Пептон - 10

25 Хлористый натрий - 5

Лактоза – 10

Цистеин гидрохлорид - 0,1

Агар-агар – 1

Печёночный бульон - до 1 л

30 Однако это среда дорогая, содержит дефицитные компоненты, поэтому малопригодна для использования в промышленных условиях.

Известна питательная среда для культивирования бифидобактерий (Патент РФ 2214454), приготовленная на основе растительного сырья. В качестве источника белка она содержит водный экстракт из листьев

- 5 амаранта, углеводную часть представляет водный экстракт из клубней топинамбура, следующего состава, г/л:

Экстракт листьев амаранта (по сухому весу) - 2,4-3,2.

Экстракт клубней топинамбура (по сухому весу) - 4,8-5,8

Цистеин гидрохлорид - 0,1

- 10 Хлорид натрия - 2,5

Вода дистиллированная - до 1 л

- Использование известной среды позволяет за 20-24 часа культивирования при 37°C получить биомассу бифидобактерий с содержанием жизнеспособных клеток не менее $1,0 \times 10^8$ в 1 мл. Однако,
- 15 недостатком известной питательной среды является низкое содержание усвояемых форм азота, необходимых для эффективного наращивания биомассы бифидобактерий.

- Известна также широко распространенная питательная среда для выделения лактобактерий (Патент РФ 2213779). Среда содержит в качестве
- 20 источника азотистого питания микробов панкреатический гидролизат казеина сухой, в качестве источника витаминов группы В экстракт кормовых дрожжей сухой, в качестве растворителя белковых компонентов натрий лимоннокислый трехзамещенный, в качестве ингибитора сопутствующих
- грамотрицательных энтеробактерий и кокковой микрофлоры натрий
- 25 уксуснокислый плавленный, глюкозу, железо и магний сернокислые 7-водные, кристаллвиолет, полимиксин М сульфат, цитрат аммония, поваренную соль, цистеин, агар микробиологический, воду дистиллированную.

- Смесь нагревают до полного расплавления агара, кипятят 2 мин,
- 30 фильтруют через ватный фильтр, после фильтрации снова доводят до кипения. Среду остужают до 50°C и разливают в стерильные чашки Петри слоем 3-5 мм, оставляют на столе при закрытых крышках на 40-60 мин для застывания агара. Затем чашки со средой и крышки отдельно подсушивают в термостате в течение 1,5 ч до высыхания конденсационной влаги на

- 5 крышках чашек, после чего чашки закрывают крышками и среда готова для использования. Среда сохраняет основные биологические свойства лактобактерий.

Недостатком известной питательной среды является относительно сложный состав среды, использование антибиотика полимиксин М и
10 дефицитного сырья – гидролизата казеина, а также необходимость проведения процесса стерилизации при температуре кипения.

Известна питательная среда "Бифидум - среда" (ТУ 9398-041-78095326-2008, ФБУН ГНЦ ПМБ г. Серпухов, Московская обл.) на основе ферментативного гидролизата козеина, содержащая в своем составе, г/л:

- 15 Гидролизат казеина – 30
Экстракт пекарских дрожжей - 5
Лактоза – 2,5
Глюкоза – 7,5
Хлористый натрий - 2,5
20 Цистеин - 0,5,
Аскорбиновая кислота – 0,5
Сульфат магния – 0,5
Натрий уксуснокислый – 0,3
Агар-агар – 0,9
25 Вода дистиллированная - до 1 л.

Известная питательная среда дает хорошие результаты при культивировании бифидобактерий и для количественного определения жизнеспособных бактерий, обеспечивает плотность 9×10^8 КОЕ/мл. Недостатком известной среды является использование дефицитных
30 компонентов и лактозы.

Наиболее близким решением задачи того же назначения к заявляемому изобретению по совокупности признаков является питательная среда для культивирования лактобактерий (RU 2002113736), содержащая в качестве источников углеводов и белка: дрожжевой экстракт, пептон, глюкозу,

- 5 цистеин, минеральные соли: марганец сернокислый, магний сернокислый, калий фосфорнокислый одно, двузамещенный, воду, а также гидролизат казеина, твин-80, агар-агар и молоко гидролизованное, при следующем соотношении компонентов, в г/л:

	Гидролизат казеина - 100,0
10	Дрожжевой экстракт - 50,0
	Пептон - 10,0.
	$MnSO_4 \cdot 4H_2O$ - 0,05
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,025
	K_2HPO_4 - 3,0
15	KH_2PO_4 - 3,0
	Цистеин солянокислый 0,2
	Глюкоза- 20,0
	Твин-80 - 1,0
	Молоко гидролизованное - до 500,0
20	Вода дистиллированная -до 500,0
	Агар-агар - 15,0

- Питательная среда обеспечивает поверхностное и глубинное культивирование лактобактерий. Недостатком известной питательной среды является использование в качестве источника белка – дефицитного сырья:
- 25 гидролизата казеина, мясного пептона и молока, твина-80, а также недостаточная эффективность питательной среды.

Раскрытие изобретения

- Задачей изобретения является создание высокоэффективной питательной среды для культивирования бифидобактерий на основе
- 30 доступного и экологически чистого растительного сырья.

Поставленная задача при осуществлении изобретения достигается тем, что предлагаемая среда для культивирования бифидо - и лактобактерий, содержит в качестве источников углеводов и белка: соевый пептон, дрожжевой экстракт, глюкозу, цистеин, минеральные соли: марганец

- 5 сернокислый, магний сернокислый, калий фосфорнокислый однозамещенный и двузамещенный, воду, а также аскорбиновую кислоту, натрий хлористый и натрий фосфорнокислый, при следующем соотношении компонентов, в г/л:

Соевый пептон – 20

- 10 Дрожжевой экстракт – 15

Глюкоза - 20

Цистеин - 0,5

Аскорбиновая кислота – 0,5

Хлорид натрия - 4,5

- 15 Сернокислый магний $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,5

Сернокислый марганец $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ - 0,05

Фосфорнокислый калий однозамещенный $KH_2PO_4 \cdot 12H_2O$ - 4

Фосфорнокислый калий двузамещенный $K_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ - 6

Вода дистиллированная - до 1 л.

- 20 Семена сои, являются природными аккумуляторами биологически активных веществ, в том числе витаминов, ферментов, аминокислот, микроэлементов и др. Уникальность ее в том, что соя единственное растение, которое поставляет полноценный белок с наилучшим сочетанием аминокислот, близкий животному. Соя характеризуется высоким
- 25 содержанием клетчатки и жиров, малым присутствием углеводов. Среди углеводов раффиноза и стахиоза способствуют снижению риска заболевания дисбиозом и являются питательным веществом для бифидобактерий. Кроме того, в состав сои входит много фосфолипидов (по ним соя лидирует среди растений), линолевая кислота, токоферолы (также лидирует среди
- 30 растительных масел), лецитин и холин, изофлавоны.

Таким образом, использование соевого пептона в составе питательной среды для культивирования бифидо- и лактобактерий благоприятно влияет на рост и активность бактерий. Использование предлагаемой среды позволяет за 20-24 часа культивирования при 37°C получить биомассу

- 5 бифидобактерий с содержанием жизнеспособных клеток не менее $4,5-7 \times 10^9$ в 1 мл в зависимости от штамма.

Показатель pH среды, поддерживаемый буфером (смесью фосфатов калия) составляет 6,9-7,2 в течение экспоненциальной фазы. Отсутствие
10 этапа стерилизации автоклавированием позволяет избежать карамелизации среды, сохранить нативность дрожжевого экстракта.

Изобретение поясняется следующим примером.

Готовили раствор из расчета на 1 л питательной среды. Взвесили 20 г соевого пептона, 15 г дрожжевого экстракта и внесли их в 0,8 л дистиллированной воды при перемешивании до полного растворения. Затем
15 взвесили 4,5 г хлористого натрия, 0,5 г цистеина, 0,5 г аскорбиновой кислоты, 0,5 г сернокислого магния и 0,05 г сернокислого марганца, фосфорнокислого калия однозамещенного 6 г, фосфорнокислого калия двузамещенного 4 г, глюкозы 20 г и последовательно добавили их в полученный раствор соевого пептона и дрожжевого экстракта. Смесь
20 перемешивали до полного растворения компонентов. Объем получаемой питательной среды довели стерильной дистиллированной водой до 1 л и питательную среду простерилизовали через мембранный фильтр с размером ячеек 0,2 мкм.

Культуру штамма *B. longum* выращивали параллельно на нескольких
25 средах: предлагаемой среде, в средах ГМК – 2, Блаурокка и Бифидум - среде течение 20 часов при 37°C. После культивирования определяли количество жизнеспособных клеток и их кислотообразующую активность, выраженную в градусах Тернера. Сравнительные результаты культивирования и показатели, характеризующие кислотообразование на основе используемых
30 сред, представлены в таблице

Питательная среда	Оптическая плотность при $\lambda=590$ нм	Количество живых клеток, ед./мл	Кислотообразующая активность, T°
-------------------	---	---------------------------------	----------------------------------

Предлагаемая	0,418	$4,5 \times 10^9$	175
ГМК -2	0,2	2×10^9	105
Блаурокка	0,245	$2,2 \times 10^9$	145
Бифидум - среда	0,28	$2,9 \times 10^9$	130

5

Состав ГМК-2: пептон, кукурузно-молочная смесь, лактоза, сухая гидролизатно-молочная основа, натрий лимоннокислый трехзамещенный, фосфорнокислый калий однозамещенный, фосфорнокислый натрий одвузамещенный, магний сернокислый, аскорбиновая кислота.

10 Полученные результаты показывают, что культивирование бифидобактерий на предлагаемой среде позволяет получать биомассу бифидобактерий с содержанием КОЕ бифидобактерий $4,5 \cdot 10^9$, т.е. в несколько раз выше, чем на среде Блаурокка, ГМК-2, и Бифидум среде.

Применяемые для приготовления предлагаемой среды пептон сои является
15 дешевым и доступным сырьем. Полученные на ее основе препараты не содержат лактозу. Подобранный состав и соотношение компонентов, а также технология приготовления позволяет избежать нежелательного взаимодействия компонентов питательной среды, и образования нерастворимых солей и осадков. А также предлагаемая питательная среда с
20 подобранным компонентным составом не требует процесса стерилизации, проводимой при высоких температурах (как обычно в автоклавах). Тем самым сохраняются высокие ростовые и биотехнологические характеристики заявляемой питательной среды. Данное обстоятельство определяет уровень значимости предлагаемой питательной среды для использования в
25 медицинских и диетологических целях.

Формула изобретения

1. Питательная среда для культивирования бифидо- и лактобактерий, содержащая источники углеводов и белка: дрожжевой экстракт, пептон, глюкозу, цистеин, минеральные соли: марганец сернокислый, магний сернокислый, калий фосфорнокислый однозамещенный, калий фосфорнокислый двухзамещенный и воду, отличающаяся тем, что она содержит соевый пептон, а также аскорбиновую кислоту, натрий хлористый при следующем соотношении компонентов, в г/л:

Соевый пептон – 20

Дрожжевой экстракт – 15

Глюкоза - 20

Цистеин - 0,5

Аскорбиновая кислота – 0,5

Хлорид натрия - 4,5

Сернокислый магний $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0,5

Сернокислый марганец $MnSO_4 \times 5H_2O$ - 0,05

Фосфорнокислый калий $KH_2PO_4 \times 12H_2O$ - 4

Фосфорнокислый натрий $K_2HPO_4 \times 2H_2O$ - 6

Вода дистиллированная - до 1 л.

2. Способ приготовления питательной среды для культивирования бифидо- и лактобактерий, предусматривающий последовательное растворение в дистиллированной воде соевого пептона, дрожжевого экстракта, хлористого натрия, цистеина, аскорбиновой кислоты, сернокислого магния, сернокислого марганца, фосфорнокислого калия однозамещенного и двухзамещенного, глюкозы, добавление дистиллированной воды до нормы, отличающийся тем, что стерилизацию проводят путем фильтрации питательной среды через мембранный фильтр с размерами ячеек 0,2 - 0,22 мкм при комнатной температуре.

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ
(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

202100041

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

C12N 1/20 (2006.01)
A61K 35/745 (2006.01)
A61K 35/747 (2006.01)
C12R 1/01 (2006.01)
C12R 1/225 (2006.01)

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)

C12N, A61K, C12R

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
D, Y	RU 2002113736 A (НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ МИКРОБИОЛОГИИ МИНИСТЕРСТВА ОБОРОНЫ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ) 27.02.2004, реферат	1, 2
Y	SAARELA M. et al. Stationary-phase acid and heat treatments for improvement of the viability of probiotic lactobacilli and bifidobacteria. Journal of Applied Microbiology, 2004, Vol. 96, No. 6, p. 1205-1214, doi: 10.1111/j.13652672.2004.02286.x, с. 1206, правый столбец, строки 9-13, 23-37, с. 1207, левый столбец, строка 4	1, 2
Y	RU 2646163 C1 (ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ВЕТЕРИНАРИИ ИМЕНИ Я.Р. КОВАЛЕНКО) 01.03.2018, с. 4, строки 30-39	1, 2
Y	Министерство здравоохранения Российской Федерации. Общая фармакопейная статья. Стерилизация. ОФС.1.1.0016.15. Государственная фармакопея Российской Федерации, 2015, XIII издание, том I, с. 8, предпоследний абзац	2
A	ХАМАГАЕВА И.С. и др. Разработка питательной среды на основе соевой сыворотки для культивирования бифидобактерий. ВЕСТНИК Восточно-Сибирского государственного университета технологий и управления (Вестник ВСГУТУ), 2018, No. 1(68), с. 36-40, ISSN: 2413-1997, с. 39	1, 2

☐ последующие документы указаны в продолжении

* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники

«D» - документ, приведенный в евразийской заявке

«Е» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее

«О» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

"Р" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

«Х» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

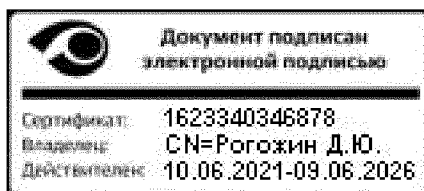
«У» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории

«&» - документ, являющийся патентом-аналогом

«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: **07/12/2021**

Уполномоченное лицо:
Начальник Управления экспертизы



Д.Ю. Рогожин